

がん分子標的探索プログラム

ゲノム分子病態研究分野

＜研究スタッフ＞

教 授 山本 健一

助 教 林 直之

助 教 小林 昌彦

学生（学部4年） 田中 陽有

技能補佐員 武 紀代子

【 研 究 概 要 】

高等動物の DNA 損傷・複製異常ストレス応答の制御に中心的な役割を果たしている ATM/ATR キナーゼファミリーの、発がんメカニズムに関係する、酵母では見られない高等動物特有の活性化の機序を明らかにすると共に、そのがん抑制における役割を細胞レベルで明らかにする。さらに、その成果をがん分子標的薬剤開発への応用を図る。

＜2012 年の研究成果、進捗状況＞

- 1) ATM 異常による酸化ストレスに対する細胞応答の異常は、ATM 異常による小脳神経細胞死、造血幹細胞の分化異常、早老、あるいは発がんに関連していると考えられているが、その機序は明らかではない。我々は、ATM が DNA 二重鎖切断以外に、プロスタグランジン、脂質、核酸由来の代謝産物により活性化され、その ATM 活性化が DNA 塩基の修飾を介さない、ATM 蛋白に対する直接作用であることを見出した。さらに、このような DNA 損傷を介さない ATM の活性化は、Chk1 や Chk2 などの活性化は起こさないが、p53 の活性化や、代謝ストレスセンサーである AMPK のリン酸化と、mTOR 活性化の指標である S6K リン酸化の抑制も引き起こすことを明らかにした。
- 2) 我々は、DNA 2 重鎖切断のセンサー因子 NBS1 が、DNA 複製損傷チェックポイント因子 ATR の下流の Chk1 のリン酸化や FancD2 のユビキチン化に必要であることを見出した。さらに、NBS1 の BRCT と FHA ドメインを含む N 末端と相互作用する ATR の部位を同定し、この ATR 部位の過剰発現により、NBS1 と ATR の結合を阻害した結果、Chk1 のリン酸化が抑制されることを示した。また NBS1 の N 端が *in vitro* で ATR を直接活性化することや、PCNA と融合した NBS1 の N 端の Rad17 ノックアウト細胞における強制発現により Chk1 のリン酸化が起こることなど、NBS1 が TOPBP1 とは独立して ATR を活性化できることを明らかにした。
- 3) NBS1 の相互作用因子として主要な CpG メチル化酵素である DNA(cytosine-5-)-methyltransferase 1(DNMT1)を分離した。NBS1 は、DNMT1 の活

性領域中の Target Recognition Domain で結合しており，NBS1 ではN末端にある FHA Domain が結合領域であった。DNMT1 は p53 に依存して Apoptosis 阻害因子 *survivin* の発現を DNA 複製異常の条件下で抑制する。我々はこの機能が NBS1 に依存していることを示した。

<今後の計画>

様々な代謝ストレスによるATMの活性化に関与するシステイン残基の同定と，その生理学的意義，特に代謝ストレス応答異常とがん化における役割との関連について細胞レベルで検討すると共に，最近その抗がん作用が注目されている糖尿病治療薬のメトフォルミンによるATM活性化とその活性化機序について検討する。また，NBS1については，ATR活性化における役割を生化学的に明らかにすると共に，NBS1の複製停止部位への集積の機序を明らかにする。さらに，NBS1-DNMT1相互作用については，今後，NBS1によるDNMT1のメチル化活性制御の詳細な解析とさらにNBS1と相互作用する他の因子の分析と機能解析を行うと共に，その生理的意義，特に，複製停止とDNAメチル化制御との関連，さらにはINK4a/ARF遺伝子のメチル化との関連について解析する。

【 研 究 業 績 】

<発表論文>

原著論文

1. Kobayashi, M., Hayashi, N., Takata, M., and Yamamoto, K. NBS1 directly activates ATR independently of MRE1 and TOPBP1. Genes to Cells, in press, 2013 (研究室主体)
2. Shigechi, T., Tomida, J., Sato, K., Kobayashi, M., Eykelenboom, J., Pessina, F., Zhang, Y., Uchida, E., Lowndes, N. F., Yamamoto, K., Kurumizaka, H., Maehara, Y., & Takata, M. ATR-ATRIP kinase complex is responsible for triggering the FA pathway activation. Cancer Res. 72: 1149-1156, 2012 (共同研究)
3. Tomida, J., Itaya, A., Uchida, E., Shigechi, T., Unno, J., Ikura, M., Masuda, Y., Matsuda, S., Adachi, J., Kobayashi, M., Meetei, R., Maehara, Y., Yamamoto, K., Kamiya, K., Matsuura, A., Matsuda, T., Ikura, T., Ishiai, M., Smogorzewska, A., and Takata, M. The Fanconi anemia core complex promotes chromatin recruitment of ATRIP-ATR kinase following replication stress. Nucleic Acids Res., in press, 2013 (共同研究)

<学会発表>

1. 塩谷裕司，小林昌彦，松郷誠一，山本健一：プロスタグランジン代謝物 15d-PGJ₂ による ATM 活性化機構。第 11 回予防環境医学研究会。2012 年 1 月，川崎（口頭）

2. 林直之, 小林昌彦, 山本健一: エピジェネティクス制御における NBS1 と DNA メチル化酵素 DNMT1 の機能。第 71 回日本癌学会。2012 年 9 月, 札幌 (口頭)
3. 小林昌彦, 林直之, 山本健一: DNA 複製異常時の ATR 活性化における NBS1 の直接的役割。第 71 回日本癌学会。2012 年 9 月, 札幌 (口頭)
4. 林直之, 小林昌彦, 山本健一: ATR 活性制御におけるチェックポイントタンパク質 NBS1 とテロメアタンパク質 TPP1 の相互作用。第 35 回日本分子生物学会。2012 年 12 月, 福岡 (口頭)
5. 林直之, 小林昌彦, 山本健一: Regulatory interactions between NBS1 and DNMT1 for epigenetical control. 第 3 回発がんスパイラル国際シンポジウム&金沢国際がん生物学シンポジウム。2013 年 1 月, 金沢 (ポスター)
6. 小林昌彦, 林直之, 山本健一: A direct role for NBS1 in ATR activation pathway induced by DNA replication stall. 第 3 回発がんスパイラル国際シンポジウム&金沢国際がん生物学シンポジウム。2013 年 1 月, 金沢 (ポスター)

<共同研究>

1. 酸化ストレスによる ATM 活性化機構 (名古屋大, 内田浩二教授; 熊本大, 赤池孝章教授; 金沢大, 松郷誠一教授, 篁俊成准教授)
2. ATR 活成果における NBS1 の役割 (京都大, 高田穰教授)

シグナル伝達研究分野

<研究スタッフ>

教 授 善岡 克次

助 教 佐藤 時春

大学院生（博士課程） Anir Enkhbat（～H24.9）

大学院生（博士課程） Baljinnyam Tuvshintugs

大学院生（博士課程） Radnaa Enkhtuya 大学院生（博士課程） 宮田 大史

大学院生（修士課程） 石川 桃絵 大学院生（修士課程） 李 蓉

大学院生（修士課程） 望月 美希 大学院生（修士課程） 太田 雅樹

大学院生（修士課程） I Ketut Gunarta（H24.10～）

事務補佐員 大橋 智江

【 研 究 概 要 】

哺乳類 MAP キナーゼ（MAPK）経路は、細胞の増殖・分化・死など細胞の様々な局面において重要な役割を担う細胞内シグナル伝達経路である。このシグナル伝達経路の異常は細胞のがん化と密接に関係しており、多くの MAPK シグナル伝達系分子が原がん遺伝子産物として報告されている。MAPK 経路に関する研究は世界中で精力的に行われているが、シグナル伝達経路間の相互作用を含む MAPK シグナル伝達系全体の制御機構や各シグナル伝達モジュールの *in vivo* における機能については不明な点が多い。本研究分野では、我々が同定した哺乳類 MAPK 経路の足場タンパク質 JSAP1 及び JLP（JSAP1 ファミリーメンバー）を切り口として、シグナル伝達の特異性維持機構、MAPK モジュールの *in vivo* における役割、及び MAPK 経路の時間的・空間的制御機構の解析を行い、最終的には細胞のがん化やがんの悪性化における JSAP1, JLP の役割とその分子機構の解明を目指して研究を行っている。また、足場タンパク質 JSAP1, JLP は、MAPK シグナル伝達系以外においても重要な役割を担っていると考えられる。そこで、JSAP1, JLP の生理的機能の解明に向けた研究にも取り組んでいる。一方、当研究所が共同利用・共同研究拠点に認定されたことを契機として、足場タンパク質研究にとどまらず、がんの転移に焦点を当てた研究に着手した。

<2012 年の研究成果、進捗状況と今後の計画>

1. 紫外線誘導性アポトーシスにおける JLP の役割とその分子機構

JSAP1-ROCK1 シグナル伝達経路は、皮膚表皮における紫外線（UVB）誘導性アポトーシスを仲介することが報告されている（*Sci. Signal.*, 2008）。しかし、基底細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現する K5-Cre マウスを用いて、JSAP1 コンディショナル

ノックアウト [JSAP1 cKO(K5-Cre)] マウスの作出・解析を行ったところ、足場タンパク質 JSAP1 は UVB 誘導性アポトーシスに関与していないことを示唆する結果が得られた。一方、JLP KO 及び JLP cKO(K5-Cre)マウスを用いた解析では、UVB 誘導性アポトーシスが有意に抑制された。現在、基底細胞特異的 JSAP1, JLP ダブル KO マウスの作出・解析を行っており、その予備的結果も JSAP1 の UVB 誘導性アポトーシスへの関与を支持していない。一方、UVB 誘導性アポトーシスの分子機構を明らかにするため、JLP cKO(K5-Cre)マウス由来のケラチノサイトやヒトケラチノサイト HaCaT 細胞を用いた解析を進めている。今後、マウス UVB 皮膚発がんにおける JLP の役割についても検討する予定である。

2. Shh-Gli 経路と MAPK 経路のクロストーク

小脳顆粒前駆細胞 (GCP) は、生後まもなく爆発的な増殖を始めるが、その際に強力なマイトジェンとして働くのはソニックヘッジホッグ (Shh) である。我々は、JSAP1-JNK 経路が GCP (髄芽腫の起源細胞と考えられている) の増殖抑制及び分化促進に関わることを、及び JSAP1 は bFGF/FGF-2 (GCP の分化誘導因子) に応答して JNK, ERK MAPK シグナル伝達系を空間的に制御することをすでに発表している。また昨年度、FGF 受容体-JNK シグナル伝達経路の活性化に伴って Gli1 タンパク質の発現レベルが減少することを見出した。本年は、様々な Gli1 変異体を用いた解析を行い、Gli1 において、これまでに報告されていない新たな領域が MAPK 経路とのクロストークに関与することを示唆する結果を得た。

3. JSAP1, JLP ダブル KO マウスの作出・解析

JSAP1, JLP の生理的機能の解明に向け、現在、様々な部位特異的 JSAP1, JLP ダブル KO マウスの作出・解析を行っている。これまでに、背側終脳特異的および小脳プルキンエ細胞特異的 JSAP1, JLP ダブル KO マウスを作製し、JSAP1, JLP 欠失は神経細胞死を引き起こすことを見出した。本年は、主に初代培養系を用いた解析を行い、JSAP1, JLP は Kinesin-1 依存的な軸索輸送の制御因子であり、JSAP1, JLP 欠失は JNK の異常な活性亢進を介して神経細胞死を誘導する、という予想外の結果を得た。

4. がん転移における転写因子 Gli1 の役割とその分子機構

転写因子 Gli1 (Shh シグナル伝達経路のエフェクター) ががんの転移に関与することは知られているが、その詳細については不明な点が多い。我々は、まず、B16 メラノーマ細胞 (低転移能株) において転写因子 Gli1 を安定に発現する細胞株の樹立を試みた。次に、受精鶏卵を用いて転移能を解析し、高転移能を示す Gli1 発現細胞株を見出した (金沢大学・遠藤良夫博士との共同研究)。今後、MAPK 経路とのクロストーク解析の結果を基に、変異 Gli1 を安定に発現する細胞株の樹立・解析を行う予定であ

る。また、転移能獲得のメカニズムを分子レベルで解明する糸口を得るために、網羅的遺伝子発現解析も計画している。

【 研 究 業 績 】

<発表論文>

原著（研究分野主体）

なし

原著（共同研究）

1. Liu, H.-X., Lopatina, O. (他 30 名, Yoshioka, K. は 20 番目) Displays of paternal mouse pup retrieval following communicative interaction with maternal mates. *Nat. Commun.* (in press) DOI: 10.1038/ncomms2336
2. Espinoza, J.L., Takami, A., Yoshioka, K., Nakata, K., Sato, T., Kasahara, Y., and Nakao, S. (2012) Human microRNA-1245 down-regulates the NKG2D receptor in natural killer cells and impairs NKG2D-mediated functions. *Haematologica* 97: 1295-1303.

<学会発表>

1. Tokiharu Sato, Baljinnyam Tuvshintugs, Anir Enkhbat, Rong Li, Katsuji Yoshioka
Cross talk between Shh-Gli and JSAP1-JNK signaling pathways in regulation of cell proliferation and differentiation
第 7 回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 2012 年 6 月, 仙台
2. Miki Mochizuki, Tokiharu Sato, Katsuji Yoshioka
Functional analysis of the MAP kinase scaffold proteins JSAP1 and JLP in cortical neurons
第 11 回アジア太平洋神経化学学会大会・第 55 回日本神経化学学会大会, 2012 年 9 月, 神戸
3. Momoe Ishikawa, Tokiharu Sato, Masaki Ohta, Katsuji Yoshioka
Role of the MAP kinase scaffold proteins JSAP1 and JLP in cerebellar Purkinje cells
小脳プルキンエ細胞における足場タンパク質 JSAP1, JLP の役割
第 35 回 日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月, 福岡
4. Baljinnyam Tuvshintugs, Tokiharu Sato, Katsuji Yoshioka
Role of JNK signaling pathway in the regulation of stability of transcription factor Gli1
第 35 回 日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月, 福岡

<外部資金>

平成 24 年度

科学研究費補助金 基盤研究(C) (研究代表者: 善岡克次) 1,300 千円
「軸索輸送における足場タンパク質 JSAP の役割とその分子メカニズム」

<学内外との共同研究>

1. 共同研究者：福永 理己郎（大阪薬科大学）
「がん細胞の増殖における Mnk プロテインキナーゼと JSAP の機能的相互作用の解析」
2. 共同研究者：松永 司（金沢大学）
「紫外線応答における足場タンパク質 JSAP1, JLP の役割とその分子メカニズム」
3. 共同研究者：高松 信彦（北里大学）
「足場タンパク質 JSAP1, JLP の機能解析」
4. 共同研究者：井関 尚一（金沢大学）
「足場タンパク質 JSAP1, JLP の組織学的解析」

腫瘍制御研究分野

<研究室スタッフ>

教 授 源 利成

准教授 川上 和之

博士研究員 廣瀬 まゆみ

堂本 貴寛

大学院生（博士課程）

松之木 愛香（心肺総合外科学）

金子 真美（心肺総合外科学）

北村 祥貴（心肺総合外科学）

下崎 真吾（整形外科）

富田 泰斗（金沢医科大学一般・消化器外科学）

松井 大輔（がん局所制御学 6 月～）【研究指導の依頼】

大学院生（修士課程）伊藤 有美（4 月～）

技能補佐員 浅香 敦子

技能補佐員（ヒトがん組織バンク） 枘井 亜希子

技能補佐員（ヒトがん組織バンク） 中 みぎわ（～9 月）

共同研究員 小竹 優範（石川県立中央病院消化器外科）

【研究概要と成果】

消化器がんを中心に、がんの多様な分子細胞病態と腫瘍外科学的特性の解明を目指して、基礎・臨床橋渡し研究を実施している。なかでも、膵がん、膠芽腫、骨軟部肉腫と再発や転移を含む難治性がんと希少がんの病態解明と制御に重点をおいている。

1. がん化シグナル誘導の分子細胞機構とがん制御への応用

(1) Wnt 経路に関わる新しい分子細胞機構の検討

Wnt 経路の制御破綻が固有のがん化シグナルを誘発する仕組みと、それを修飾する分子細胞機構について β -カテニンを中心に研究を進めている。そして、大腸がんの腫瘍-宿主境界の腫瘍環境で活性化される β -カテニンを機軸とするがん化シグナル回路の病理作用を明らかにしてきた。そのなかで、 β -カテニンが RNA 安定化因子 CRD-BP (coding region determinant-binding protein) を転写誘導することを同定した。本年は、大腸がん病巣における CRD-BP の発現と各種がん関連分子の mRNA 安定化による病的作用や臨床所見との関連について研究を継続している。

がん細胞における β -カテニン活性化の仕組みについて従来、その分解複合体の構成因子とユビキチン経路による蛋白質安定性の調節異常に焦点が当てられてきた。一方、 β -カテニン活性化の必須要件である核移送の仕組みやその細胞内微細構造の研究は未開の領域である。 β -カテニンの通過経路は核膜孔であり、30 種類の核膜孔複合体 (nuclear pore complex: NPC) 因子 (nucleoporins: Nups) から構成される。本年は、 β -カテニンの核移送に作用する Nup(s) を同定するために、複数の大腸がん細胞株と少数例の大腸がん組織を対象に両分子群の発現と局在の比較解析を開始した。

(2) glycogen synthase kinase (GSK) 3 β を標的とするがん治療法の開発と臨床応用

消化器がんと脳膠芽腫を中心に異常活性を示す GSK3 β が腫瘍細胞の生存、増殖、遊走・浸潤を推進し、治療（抗がん剤、放射線）抵抗性を賦与することを発見した。そして、その阻害によるがん治療効果の分子機構の検討と難治がん治療の臨床研究を進めている。2009 年から GSK3 β 阻害医薬品の併用による再発膠芽腫治療の医師主導型第 I/II 相臨床研究 (UMIN: 000005111) を本学附属病院脳神経外科で実施し、本年までにその安全性と治療効果を確認した。今後、本学を中心に多施設臨床研究を構想し、厚労省科学研究費に応募する。進行腫瘍がんに対する同様の臨床研究 (UMIN: 000005095) は 2011 年 4 月から金沢医科大学病院集学的がん治療センターで開始され、現在も症例を登録、集積中で、その成果にもとづく新しい腫瘍がん治療法として共同出願を予定している。本年は研究対象を、希少かつ難治性の骨肉腫の治療と消化管実験発がん動物モデルに広げ、GSK3 β 阻害によるがん治療とがん（化学）予防効果についてそれぞれ本学整形外科、消化器外科と共同研究を開始した。

本酵素阻害によるがん治療効果の分子機構として、がん細胞の糖エネルギー代謝に及ぼす作用を検討している。これまでのメタボローム解析から、がん細胞特有の代謝 Warburg 効果における GSK3 β の責任作用を示唆する予備成果がえられている。現在、その中心的役割を担うと考えられる代謝酵素と GSK3 β の相互作用について機能解析を進めている。創薬への応用を考え、cell-based ELISA による新規 GSK3 β 阻害剤のスクリーニング法の開発のため、GSK3 β の代表的な基質であるグリコーゲン合成酵素とその第 641 セリンリン酸化ペプチド特異抗体を作成中である。

2. がんの分子生物学的分類によるオーダーメイドがん化学療法

抗がん剤の感受性・有害事象予測に臨床応用できる分子生物学的診断法を開発し、オーダーメイド治療を実現させることを目的に研究を進めている。大腸がんでは常用される 5-FU の個別化を実現した後、放射線治療や免疫治療を含めた集学的治療の個別化につなげることを目標にしている。本年は、がんのクロマチン構造が 5-FU の DNA 取り込みと修復過程に関与することを大腸がん細胞で解析した。この機構は thymidylate synthase (TS) 阻害による 5-FU の効果発現機構とは異なるため、がん細胞が両機構のいずれに反応性が高いかにより 5-FU の個別化が可能である。現在、臨床試験での検証を計画中である。

3. エピジェネティクスを標的にするがん診断・治療法の開発

大腸がんをモデルとして、発がん経路をジェネティック・エピジェネティックな変化により説明・細分類し、診断・治療に臨床応用することを直近の目的としている。エピジェネティックな変化のうち、とくに DNA メチル化を解析対象として、がん表現型である CpG island methylator phenotype (CIMP) やゲノム全体のメチル化状態の代用マーカーである LINE-1 を解析している。また、microsatellite instability (MSI), chromosomal instability などの表現型や K-ras, B-raf, APC 遺伝子変異等のジェネティック解析を順次追加し、大腸がん発癌経路の詳細を構築中である。本年は、LINE-1 のメチル化が大腸がんの進行に伴い変化する様式を、各臨床ステージのがん組織検体を用いて解析した。その結果、LINE-1 の低メチル化はがん進展の早期に確定し、がん浸潤や転移に伴っての変化は乏しいと考えられた。この結果から LINE-1 の低メチル化をターゲットしてがんの早期診断が可能と考えられる。現在、がん早期診断法開発を目的として、血液や便中の DNA メチル化解析を行っている。

4. ヒト消化管がん組織検体資源化プロジェクト

がんの分子・細胞レベルの変化，代謝変動やがん動物モデルの解析から得られる結果を実際のがん病巣で具現化してはじめて，がんの臨床に導入することができる．医科学研究に共通する時代の要請である．この目的で，消化管がんの研究や臨床研究の基盤資源として，2008 年から本学附属病院，金沢医科大学病院と市中の基幹病院（金沢赤十字病院，石川県立中央病院）外科と連携して，本事業を開始した．2010 年にこの事業を当研究所ヒトがん組織バンクに継承し，大腸がんと胃がん患者様の手術検体から正常と病巣組織を系統的に集積している．本事業の概要は昨年までの当研究所年報を参照されたい．これらの組織・バイオバンクを利用して複数の共同研究が学内外で進行している．

【研究業績】

<論文発表>

原著

1. Kitano A, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T, Ishigaki Y, Endo Y, Takino T, Sato H, Sai Y, Miyamoto KI, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 β is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. *PLoS ONE*, in press.
2. Matsunoki A, Kawakami K, Kotake M, Kaneko M, Kitamura H, Ooi A, Watanabe G, Minamoto T. LINE-1 methylation shows little intra-patient heterogeneity in primary and synchronous metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*, in press.
3. Nakajima H, Koizumi K, Tanaka T, Ishigaki Y, Yoshitake Y, Yonekura H, Sakuma T, Fukushima T, Umehara H, Ueno S, Minamoto T, Motoo Y. Loss of HITS (FAM107B) expression in cancer of the multiple organs: a tissue microarray analysis. *Int J Oncol*, 2012. Jul 10. doi: 10.3892/ijo.2012.1550. [Epub ahead of print]
4. Loh M, Chua D, Yao Y, Soo RA, Zeps N, Platell C, Kawakami K, Minamoto T, Iacopetta B, Soong R. Can population differences in chemotherapy outcomes be inferred from differences in pharmacogenetic frequencies? *Pharmacogenomics J*, 2012 Jun 26. doi: 10.1038/tpj.2012.26. [Epub ahead of print].
5. Kong D, Piao YS, Oshima H, Oguma K, Minamoto T, Yamada Y, Sato K, Yamashita S, Ushijima T, Ishikawa T, Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric epithelial cells. *Oncogene* 31(35): 3949-60, 2012.
6. Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakamura Y, Takata T, Nakaya N, Nakajima H, Sato I, Zhao X, Kitano A, Kawakami K, Tanaka T, Takegami T, Tomosugi N, Minamoto T, Motoo Y. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. *J Gastroenterol* 47(3): 321-33, 2012.
7. Mimura M, Masuda A, Nishiumi S, Kawakami K, Fujishima Y, Yoshie T, Mizuno S, Miki I, Ohno H, Hase K, Minamoto T, Azuma T, Yoshida M. AP1B plays an important role in intestinal tumorigenesis with the truncating mutation of an *APC* gene. *Int J Cancer* 130(5): 1011-20, 2012.

著書・総説

8. Shimasaki T, Kitano A, Motoo Y, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 β in pancreatic cancer development, progression and resistance to therapy. *J Carcinog* 11: 15, 2012.
9. Nakada M, Furuta T, Hayashi Y, Minamoto T, Hamada JI. The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Front Oncol* 2: 98, 2012.
10. Minamoto T, Kotake M, Nakada M, Shimasaki T, Motoo Y, Kawakami K. Distinct pathologic role for glycogen synthase kinase 3 β in colorectal cancer progression. In: *Colorectal Cancer Biology - From Genes to Tumor*, Rajunor Ettarh (Ed.), ISBN: 978-953-51-0062-1, pp. 107-34, 2012; InTech.

<学会発表>

国際学会

1. Toshinari Minamoto, Wei Mai, Satoru Kyo, Abbas Shakoori, Katsuyoshi Miyashita, Kenji Yokoi, Takeo Shimasaki, Yoshiharu Motoo, Kazuyuki Kawakami. Deregulated GSK3 β sustains gastrointestinal cancer cells by modulating hTERT and telomerase. 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR 2012), March 31-April 4, 2012, Chicago, Illinois, U.S.A.
2. Aika Matsunoki, Kazuyuki Kawakami, Masanori Kotake, Mami Kaneko, Go Watanabe, Toshinari Minamoto. LINE-1 methylation level is a molecular marker with little intra-patient heterogeneity in primary and synchronous metastatic colorectal cancer. 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR 2012), March 31-April 4, 2012, Chicago, Illinois, U.S.A.
3. Nakada M, Chikano Y, Sabit H, Furuta T, Miyashita K, Hayashi Y, Sato H, Kawakami K, Minamoto T, Hamada JI. Aberrant glycogen synthase kinase 3 β is involved in glioma invasion. 9th Meeting for the Asian Society for Neuro-Oncology, April 20-22, 2012, Taipei, Taiwan.
4. Domoto T. Cleavage of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 by membrane-type MMP-1 stimulates tumor invasive growth. The Joint Symposium of the 7th International Symposium of Institute Network (第6回附置研究所ネットワーク国際シンポジウム) and the 45th IDAC Symposium, the 2nd Symposium for Joint Usage/Research Center of Aging, June 14-15, 2012, Smart Ageing International Research Center, Institute of Development, Ageing and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan.
5. Kazuyuki Kawakami, Aika Matsunoki, Masanori Kotake, Mami Kaneko, Hiroataka Kitamura, Go Watanabe, Toshinari Minamoto. Knockdown of LINE-1 enhances sensitivity to 5-FU in LINE-1-hypomethylated colorectal cancer cell. 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR 22), July 7-10, 2012, Centre Convencions International Barcelona, Barcelona, Spain.
6. Nakada M, Hayashi Y, Miyashita K, Kinoshita M, Furuta T, Sabit H, Kita D, Hayashi Y, Uchiyama N, Kawakami K, Minamoto T, Hamada JI. Phase I/II study for recurrent glioblastoma with the drugs inhibiting GSK3 β . Society for Neuro-Onology 17th Annual Meeting 2011, November 15-18, 2012, Washington DC, U.S.A.
7. Pyko VI, Nakada M, Furuyama N, Lei T, Hayashi Y, Kawakami K, Minamoto T, Fedulau AS, Hamada JI. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition sensitize human glioma cells to

temozolomide by means of c-myc signaling. Society for Neuro-Onology 17th Annual Meeting 2011, November 15-18, 2012, Washington DC, U.S.A.

国内学会

8. 島崎猛夫, 石垣靖人, 高田尊信, 川上和之, 上田順彦, 友杉直久, 小坂健夫, 源利成, 元雄良治. GSK3 β 標的治療と化学療法を併用する膵がんの新規治療戦略と分子基盤. 第 43 回日本膵臓学会大会, 2012 年 6 月 28-29 日, ホテルメトロポリタン山形, 山形市.
9. Shimasaki T, Kitano A, Minamoto T, Motoo Y. Aberrant glycogen synthase kinase 3 β is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy (島崎猛夫, 北野綾子, 源利成, 元雄良治. GSK3 β の異常活性に起因する膵がん細胞の浸潤と治療抵抗性). 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会: IS1: Biomarker & Developmental Therapeutics (English Session), 2012 年 7 月 26-28 日, 大阪国際会議場, 大阪.
10. Mami Kaneko, Kazuyuki Kawakami, Masanori Kotake, Hiroataka Kitamura, Go Watanabe, Toshinari Minamoto. LINE-1 methylation level is a potential marker of the sensitivity to 5-FU plus oxaliplatin in colorectal cancer cells (金子真美, 川上和之, 小竹優範, 北村祥貴, 渡邊 剛, 源利成. LINE-1 メチル化は大腸がん細胞のオキザリプラチン・5-FU 併用処理への感受性と相関する). 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, ロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館, 札幌.
11. Takeo Shimasaki, Ayako Kitano, Yasuhito Ishigaki, Takanobu Takata, Kazuyuki Kawakami, Tsutomu Takegami, Naohisa Tomosugi, Toshinari Minamoto, Yoshiahu Motoo. GSK3 β is an emerging therapeutic target in pancreatic cancer: its implication for cancer cell migration and invasion (島崎猛夫, 北野綾子, 石垣靖人, 高田尊信, 川上和之, 竹上 勉, 友杉直久, 源利成, 元雄良治. 膵癌の新規治療標的としての glycogen synthase kinase (GSK) 3 β : がん浸潤に対する作用). 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, ロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館, 札幌.
12. ピコ イリア, 中田光俊, 古山奈月, 藤 雷, 林 裕, 川上和之, 源利成, Fedulau Aliaksandr S, 濱田潤一郎. Sensitizing human glioma cells to temozolomide by glycogen synthase kinase 3 β inhibition. 第 13 回日本分子脳神経外科学会, 2012 年 9 月 20-21 日, 熊本.
13. 島崎猛夫, 川上和之, 上田順彦, 小坂健夫, 友杉直久, 源利成, 元雄良治. GSK3 β 標的治療を併用した膵癌の新規治療戦略と分子基盤. 第 20 回 JDDW 2012 / 第 54 回日本消化器病学会大会, 2012 年 10 月 10-13 日, 神戸国際展示場・ポートピアホテル・神戸国際会議場, 神戸.
14. 小竹優範, 川上和之, 金子真美, 北村祥貴, 伴登宏行, 山田哲司, 源利成. 【優秀演題】大腸がんにおける microsatellite instability と CpG island methylator phenotype の解析. 第 20 回 JDDW 2012 / 第 10 回日本消化器外科学会大会, 2012 年 10 月 10-13 日, 神戸国際展示場・ポートピアホテル・神戸国際会議場, 神戸.
15. 宮下勝吉, 中田光俊, 林 裕, 渡邊卓也, 木下雅史, 古田拓也, 淑瑠へムラサビ, 喜多大輔, 林 康彦, 内山尚之, 川上和之, 源利成, 濱田潤一郎. 再発神経膠芽腫に対して GSK3 β 阻害作用を有する既存薬剤を用いた第 I・II 相臨床試験

における剖検例の免疫組織学的検討. 第 71 回日本脳神経外科学会総会, 2012 年 10 月 17-19 日, 大阪.

16. 中田光俊, 林 裕, 宮下勝吉, 木下雅史, 古田拓也, 淑瑠へムラサビット, 喜多大輔, 林 康彦, 内山尚之, 川上和之, 源 利成, 濱田潤一郎. GSK3 β 阻害作用を有する既存薬剤を用いた再発膠芽腫治療の第 I・II 相臨床試験, 第 50 回日本癌治療学会学術集会, 2012 年 10 月 25-27 日, パシフィコ横浜, 横浜.
17. 下崎真吾, 山本憲男, 林 克洋, 西田英司, 武内章彦, 丹沢義一, 木村浩明, 五十嵐健太郎, 稲谷弘幸, 源 利成, 土屋弘行. GSK-3 β 阻害にもとづく骨肉腫に対する分子標的治療の可能性. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2012 年 10 月 26-27 日, 名古屋国際会議場, 名古屋.
18. 島崎猛夫, 北野綾子, 友杉直久, 川上和之, 源 利成. 【優秀演題】GSK3 β 異常活性による膵がんの浸潤と治療抵抗性. 第23回日本消化器癌発生学会総会, 2012 年11月15-16日, ルネッサンスリゾートナルト, 鳴門市.
19. 宮下勝吉, 中田光俊, 林 裕, 木下雅史, 古田拓也, 淑瑠へムラサビット, 渡邊卓也, 喜多大輔, 林 康彦, 内山尚之, 川上和之, 源 利成, 濱田潤一郎. 再発膠芽腫に対して GSK3 β 阻害作用を有する既存薬剤を用いた単施設第 I・II 相臨床試験. 第 30 回日本脳腫瘍学会, 2012 年 11 月 25 日-27 日, 広島

司会

20. 深町博史, 源 利成. シグナル伝達阻害剤 (3) / Signal transduction inhibitors (3). 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, ロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館, 札幌.
21. 源 利成, 今野雅允. ワークショップ 3 : 消化器癌とプロテアソーム・オートファジー. 第 23 回日本消化器癌発生学会, 2012 年 11 月 15-16 日, ルネッサンスリゾートナルト, 鳴門市.

講演, その他

22. 源 利成. がんを含む慢性進行性疾患の創薬標的 GSK3 β . 第 1 回富山大学和漢医薬学総合研究所・金沢大学がん進展制御研究所ジョイントセミナー, 2012 年 1 月 18 日, 富山大学和漢医薬学総合研究所民族薬物資料館, 富山.
23. 源 利成. 発がん学, がん医科学とがん医療—消化器がんを中心に—. がんにおける質の高い看護師育成研修会, 2012 年 1 月 18 日, 金沢大学附属病院, 金沢.
24. 源 利成. 大腸がん研究から開発した新しいがん治療法—分子基盤と膠芽腫治療への橋渡し—. 第 5 回金沢脳腫瘍セミナー, 2012 年 1 月 21 日, ホテル日航金沢, 金沢.
25. 源 利成. がん細胞の代謝特性と治療. 金沢医科大学大学院第 29 回医学研究セミナー, 2012 年 1 月 27 日, 金沢医科大学, 内灘町.

26. 源 利成. 難治がんの新しい治療法—膵がんと脳腫瘍への取り組み—. 金沢大学公開講座：がん研究の最前線, 2012 年 6 月 16 日, 金沢大学サテライト・プラザ(西町), 金沢.
27. 源 利成. がん医科学とがん医療—消化器がんを中心に—. がんにおける質の高い看護師育成研修会, 2012 年 10 月 18 日, 金沢大学附属病院, 金沢.
28. 源 利成. 大腸がん研究から発見したがん治療標的—金沢発膠芽腫治療法への展開—. STOP 学術講演会, 2012 年 11 月 22 日, 福井パレスホテル, 福井.

＜外部資金＞（2012 年が含まれる課題）

1. 2012 年度 金沢大学がん進展制御研究所共同研究（一般）
元雄良治（代表）源 利成, ほか（分担）
課題：GSK3 β 阻害による新規膵がん化学療法の開発と臨床試験
500 千円
2. 2012 年度 金沢大学がん進展制御研究所共同研究（一般）
小坂健夫（代表）源 利成, 川上和之, ほか（分担）
課題：大腸がんの分子病理学的特性の解析と診断, 治療のための分子指標の解明
750 千円
3. 2011－2013 年度 科学研究費補助金（基盤研究 B）：課題番号 23390321
川上和之（代表）源 利成（分担）曾我朋義（連携）
課題：ゲノムの低メチル化とレトロポゾンの活性化を特徴とする大腸がんの診断・治療開発
16,340 千円
4. 2011－2013 年度 科学研究費補助金（基盤研究 C）：課題番号 23591955
廣瀬まゆみ（代表）源 利成, 川上和之（分担）
課題：GSK3 β 阻害による消化器がん治療法の開発と分子機構の解明
4,550 千円
5. 2011－2012 年度 科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究）：課題番号 23659643
源 利成（代表）川上和之（分担）曾我朋義（連携）
課題：がん特異的エネルギー代謝を標的とする消化器がん治療法の開発
3,340 千円
6. 2011－2013 年度 科学研究費補助金（基盤研究 C）：課題番号
中田光俊（代表）源 利成（連携）
課題：悪性グリオーマの浸潤シグナルを狙った分子標的療法の確立
4,550 千円
7. 2011－2013 年度 科学研究費補助金（基盤研究 C）：課題番号 23590898
中島日出夫（代表）源 利成, ほか（分担）
課題：がん温熱療法の新規分子マーカー候補 FAM107 ファミリー蛋白質の発現・機能解析
5,200 千円
8. 2011－2013 年度 科学研究費補助金（基盤研究 C）：課題番号 23591016
島崎猛夫（代表）源 利成, ほか（分担）

課題：化学療法により誘発される EMT 誘導因子の同定とその制御による膵がん
治療法の開発

5,200 千円

9. 2010－2012 年度 科学研究費補助金（基盤研究 A）：課題番号 20890086

源 利成（代表）川上和之，太田哲生（分担）大野博司（連携）

課題：基幹的細胞調節経路の異常に起因する消化器がんの病態解明とがん制御への応用

41,990 千円

奨学寄附金

10. 2012 年 3 月 財団法人石川県予防医学協会 670 千円

11. 2012 年 3 月 財団法人石川県予防医学協会 400 千円

12. 2012 年 3 月 株式会社アルプ 147 千円

<共同研究>

1. 2012 年度 金沢大学がん研究所共同研究（一般）

金沢医科大学腫瘍内科学 元雄良治，島崎猛夫，ほか

課題：GSK3β阻害による新規膵がん化学療法の開発と臨床試験

2. 2012 年度 金沢大学がん研究所共同研究（一般）

金沢医科大学消化器外科学 小坂健夫，富田泰人，ほか

課題：大腸がんの分子病理学的特性の解析と診断，治療のための分子指標の解明

<特許出願>

なし

<報 道>

1. 小竹優範，ほか，川上和之，源 利成．北國がん基金 27 日に助成金贈呈式．解明，治療，確かな歩み．昨年 of 助成対象者の成果：組織のデータを蓄積．北國新聞 日刊，2012 年 9 月 21 日．

機能ゲノミクス研究分野

<研究スタッフ>

教 授 鈴木 健之

助 教 石村 昭彦

博士研究員 丹下 正一朗

事務補佐員 小田原 敦子

研究生 寺島 農

大学院生（博士課程）Zanabazar Enkhbaatar

大学院生（博士課程）Dulamsuren Oktyabri

【 研 究 概 要 】

レトロウイルス挿入変異によってマウスに発症した腫瘍から，ウイルスタギングを用いて新しいがん関連遺伝子群の探索を進めてきた。その結果，ヒストンや DNA のメチル化修飾に関わる酵素の遺伝子が，ウイルスの標的として高頻度に同定された。これらの酵素が引き起こすエピジェネティクス制御の異常は，可逆的に正常に戻すという治療戦略が想定されるため，次世代のがん治療の標的として注目される。現在，がんの発症・悪性化の様々なステップにおいて，これらメチル化制御酵素の果たす役割とその作用メカニズムを明らかにするために研究を進行している。

<2012 年の研究成果，進行状況と今後の計画>

1) がんの悪性進展過程におけるヒストンのメチル化制御酵素群の関与

がん細胞の浸潤をはじめ，上皮・間葉転換（EMT）や薬剤耐性などは，がんの悪性化や難治性の本態であり，これらを阻止するがんの治療法の開発は極めて重要である。挿入変異の標的として同定したヒストンのメチル化酵素（EZH2, SETD7, SMYD2 など）と脱メチル化酵素（JMJD5, PLU1, UTX, JMJD3 など）について，乳がん，肺がん，大腸がんなど様々ながん細胞株を用いて発現解析を行なった。その結果，細胞の浸潤能，上皮系・間葉系の特徴，抗がん剤耐性などの性質と相関性を示す発現様式をもつ酵素を複数同定することができた。また，酵素によって発現調節される標的遺伝子を探索する方法として，網羅的 cDNA シークエンスデータを情報学的に処理するデジタル発現プロファイル法を確立し，標的遺伝子候補のデータベースを作成した。

2) がん関連遺伝子候補 JMJD5 の機能解析

候補遺伝子のひとつ JMJD5 の生理機能や発がんにおける役割を解明するために，ノックアウト（KO）マウスを作製した。Jmjd5 null マウスは，胚性致死の表現系を示

し、その原因のひとつが、細胞周期制御因子 p21/Cdkn1a の異常な発現亢進であることを見いだした。マウス胚線維芽細胞を用いた解析からも JMJD5 が細胞増殖の制御に重要であることが示された。クロマチン免疫沈降解析の結果、JMJD5 は p21/Cdkn1a 遺伝子の転写領域上のヒストン H3K36 のメチル化状態を変化させて、その発現調節に関与することが明らかになった（文献 1）。さらに、p21/Cdkn1a 以外の p53 によって発現制御される標的遺伝子の解析や、Jmjd5 KO マウスと p53 KO マウスとの交配実験などから、JMJD5 が p53 シグナル経路を Fine-tuning する新しいタイプの制御因子であることを見いだした。また、JMJD5 は、ヒストンの脱メチル化酵素としてのほたらしき以外にも、転写制御因子 NFATc のユビキチン修飾に影響を与えて、骨細胞の分化を負に調節するという機能を持つこともわかった。（文献 2）。

3) 上皮-間葉転換 (EMT) に関与するヒストンのメチル化制御酵素

がん細胞の細胞浸潤能を亢進する活性を既に報告したヒストン H3K4 脱メチル化酵素 PLU1 が、細胞の EMT を誘導することを新たに見いだした。この際、EMT の誘導に重要な転写因子である ZEB1, ZEB2 の発現を抑制している microRNA-200 ファミリーの発現をヒストンのメチル化を介して調節することを証明した（投稿中）。一方、H3K27 脱メチル化酵素 JMJD3 は、その発現の低下が EMT を促進するが、同じ miR-200 ファミリーを標的としてその発現を調節することがわかった。すなわち、Bivalent なヒストンのメチル化修飾による microRNA のエピジェネティックな制御が、EMT の可逆的性質に関係している可能性が示された。さらに、PLU1, JMJD3 以外にも EMT に影響を与えるメチル化制御酵素を現在 3 種類同定しており、それぞれ異なるメカニズムでの作用が示唆されている。

4) 薬剤耐性獲得に関与するヒストンのメチル化制御酵素

分子標的治療薬イレッサに感受性の肺がん細胞株において、JMJD3 脱メチル化酵素をノックダウンすると、耐性獲得能が著しく上昇することをこれまでに検出してきた。この細胞株においても、miR-200 ファミリーの発現抑制に伴う転写因子 ZEB1, ZEB2 の発現上昇と EMT の誘導が観察された。したがって、JMJD3 ノックダウンによる薬剤耐性獲得の亢進メカニズムのひとつとして、EMT が重要な役割を果たしていることが示された。

5) がん細胞における DNA の脱メチル化に関与する酵素群の発現解析

TET ファミリー (TET1, 2, 3) タンパク質は、ゲノム DNA のメチル化されたシトシン (5mC) をヒドロキシメチル化 (5hmC) する酵素であり、DNA の積極的脱メチル化の第一段階を担う。様々な細胞、組織での TET ファミリー遺伝子の発現解析を行ったところ、TET1 酵素の発現と、細胞の EMT、幹細胞的性質、セネセンスとの関

係性を示す結果が得られた。また、TET1 自身の発現の制御に対する DNA のメチル化やヒストンのメチル化の関与も示唆された。がんにおける DNA の積極的脱メチル化の役割や、ヒストンと DNA のメチル化制御の新たな関係性を発見することを目指して、TET1 の機能解析を現在進行している。

【 研 究 業 績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T and Suzuki T. Jmjd5, an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of *Cdkn1a* expression. Development, 139, 749-759, 2012.

(共同研究)

2. Youn MY, Yokoyama A, Fujiyama-Nakamura S, Ohtake F, Minehata K, Yasuda H, Suzuki T, Kato S and Imai Y. JMJD5, a Jumonji C (JmjC) domain-containing protein, negatively regulates osteoclastogenesis by facilitating NFATc1 protein degradation. J. Biol. Chem., 287, 12994-13004, 2012.

著書・総説

1. 鈴木健之. “第 5 章造血系第 1 節 自然発症モデル BXH2 および AKxD マウス” 「疾患モデルの作製と利用 がん」中村卓郎編集, 399-408 頁, エル・アイ・シー, 2012

< 学会発表 >

国内学会

1. Suzuki T, Terashima M, Enkhbaatar Z, Oktyabri D, and Ishimura A. Functional characterization of histone modifying enzymes in the process of malignant progression of cancer. 第71回日本癌学会学術総会 (札幌2012年9月)
2. Oktyabri D, Terashima M, Enkhbaatar Z, Tange S, Ishimura A and Suzuki T. Functional analysis of histone demethylases in epithelial-mesenchymal transition of cancer cells. 第35回日本分子生物学会年会 (福岡2012年12月)
3. Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T and Suzuki T. Jmjd5, an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of p53-target genes expression. 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡 2012 年 12 月)
4. Tange S, Zhou Y and Nakanishi A. Signaling pathways that involve in human astroviral

infection. 第 35 回日本分子生物学会年会（福岡 2012 年 12 月）

一般対象

1. 鈴木健之, 金沢大学市民公開講座「ウイルス研究とがん」, 金沢 2012 年 6 月

＜外部資金＞

1. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 鈴木健之
研究課題名「ウイルス挿入変異法で同定されたエピゲノム制御因子による疾患発症機構の解析」 1,700 千円
2. 文部科学省科学研究費補助金, 新学術領域研究 (がん微小環境), 研究分担者 鈴木健之
研究課題名「呼吸器悪性腫瘍の微小環境の特性を標的とした新規制御法の開発」 1,000 千円
3. 文部科学省科学研究費補助金, 若手研究 (B), 研究代表者 石村昭彦
研究課題名「ウイルス挿入変異法で同定された新規がん関連遺伝子 Jmjd5 の機能解析」 1,400 千円

＜共同研究＞

1. 原 孝彦 副参事研究員 東京都医学総合研究所 ウイルス挿入変異によって同定されたがん関連遺伝子 JMJD5 の血液・血管の発生における機能解析
2. 今井 祐記 特任講師 東京大学分子細胞生物学研究所 ヒストン脱メチル化酵素 JMJD5 の骨分化における機能解析
3. 木村 宏 准教授 大阪大学大学院生命機能研究科 がんの悪性化に関与するヒストン修飾変化とその解析ツールの開発
4. 本田 浩章 教授 広島大学原爆放射線医科学研究所 がんの発症・悪性進展過程におけるヒストン脱メチル化酵素 JMJD3 の役割の解析
5. 小出 寛 准教授 金沢大学医薬保健研究域医学系 DNA 脱メチル化関連酵素の幹細胞およびがん細胞における役割の解析